尿 I 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒使用说明书

【产品名称】

通用名称：尿 I 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒

英文名称：(Urine CrossLaps® ELISA)

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

用于人尿中I型胶原C端肽降解产物的定量检测。尿I型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒(Urine CrossLaps® ELISA)用酶联免疫法定量测定人尿中I型胶原C端肽降解产物。

除上面指定用途以外，Nordic Bioscience Diagnostics A/S(北欧生物科学与诊断有限公司)对此试剂盒的任何其他使用及其因此导致的后果不予负责。对未按照本手册所示方法而错误使用本试剂不予负责。尿I型胶原C端肽酶联免疫吸附分析可作为**人骨吸收的指标而**用于**体外诊断，并有助于**

A. 监测骨吸收在以下情况下的变化

1) 绝经妇女的抗骨吸收治疗

a)用激素和类激素药物进行激素替代疗法(HRT)

b) 二膦酸盐治疗

2) 被诊断为骨量减少的个体抗骨吸收治疗

a)用激素和类激素药物进行激素替代疗法(HRT)

b) 二膦酸盐治疗

B. 预测接受抗骨吸收治疗的绝经妇女的骨密度(BMD)应答

a)用激素和类激素药物进行激素替代疗法(HRT)

b) 二膦酸盐治疗

【检测的概述和说明】

I型胶原占骨有机基质90%以上，并主要在骨中合成(1)。骨骼更新时，I型胶原被降解，短肽片段进入尿液。这些片段可用尿I型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒检测，并有文献报道此分析有助于患骨代谢疾病的病人抗骨吸 收治疗后的研究(2—17) 。

未确立该检测用于预测骨质疏松的发展或未来骨折发生的危险性，也未确立此检测用于甲状旁腺机能亢进或甲状腺机能亢进。当用于治疗监测时，影响骨吸收的患者临床状况如骨转移，甲状旁腺机能亢进或甲状腺机能亢进，会干扰检测结果。

尿I型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒检测结果应该与临床研究结果和其它诊断结果结合使用，且不应作为起始或改变治疗方案的唯一指标。

不要互相换算血清I型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒和尿I型 胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒的测定值。

【检验原理】

尿 I 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒是基于抗 CrossLaps® 抗体对可 溶性 CrossLaps® 抗原或包被 CrossLaps®抗原的微孔的竞争性结合。标准品、质控和待测样本加入微孔板中，再加入抗 CrossLaps® 抗体，18-22°C 孵育 1 小时。 洗涤微孔板，加入过氧化物酶偶联抗兔抗体，18-22°C 下再孵育 1 小时。第二次洗涤微孔板后，与生色底物孵育 15 分钟，终止显色反应，测量吸光度。

【主要组成成份】

1. 微孔板

预包被 CrossLaps®抗原的 6 条微孔板(2 x 8 孔/每条)，置于一塑料框架中。

2. CrossLaps®标准 A(瓶 A)

一瓶(11 mL)可直接使用的含有蛋白质稳定剂、去污剂和防腐剂的缓冲溶液。

3. CrossLaps®标准 B 一 F (瓶 B 一瓶 F)

五瓶(0.3mL/瓶)可直接使用的 CrossLaps®标准 品(溶于含蛋白质稳定剂、去 污剂和防腐剂的缓冲溶液中)。

4. 尿质控 (瓶 CO)

一瓶(0.5mL/瓶)可直接使用的人尿样本(溶于含蛋白质稳定剂、去污剂和防腐剂的缓冲溶液中)。准确浓度标在瓶上。

5. 一抗溶液(1 号瓶)

一瓶(12mL)可直接使用的兔抗 CrossLaps®抗体，溶于含蛋白质稳定剂、去污剂和 防腐剂的缓冲溶液中。

6. 过氧化物酶偶联抗体 (2 号瓶)

一瓶(12mL)可直接使用的辣根过氧化物酶偶联的抗兔抗体(溶于含蛋白质稳定剂、去污剂和防腐剂的缓冲溶液中)。

7. 底物溶液 (瓶 TMB)

一瓶(12mL)可直接使用的四甲基联苯胺(TMB)底物(溶于酸性缓冲液中)。

请注意该生色底物可带浅蓝色。

8. 终止液 (瓶 ST)

一瓶(12mL)可直接使用的 0.18 mol/L 硫酸溶液。

9. 清洗溶液 (瓶 W)

一瓶(20mL)含有去污剂和防腐剂的浓缩清洗缓冲液。用前 1+50 的比例稀释。

10. 封口膜

孵育时密封微孔板的粘性薄膜。

【储存条件及有效期】

收到尿I型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒后应在 2一8°C保存。试剂盒在此条件下稳定至包装盒上所标有效日期。

【适用仪器】

适用于具有 450nm、650nm 波长的所有全自动、半自动酶标仪。

【样本要求】

用尿 I 型胶原 C 端肽酶联免疫吸附分析试剂盒测定的尿肽水平不随饮食摄入量变化，然而为保持一致，建议用第二次晨尿。为了对个体患者进行监测，后续 样本应该在与基线样本相同的条件下采集 (即第二次晨尿) 。

请注意为取得最佳结果，建议将样本离心(如 2000g，10 分钟)。冷藏保存尿样(2 一 8° C)应不超过一星期，冷冻样本 (<-18° C)可保存较长时间。

若样本明显被全血污染可干扰样本分析。这些样本应丢弃并重新取样。

【检验方法】

所需的仪器及试剂(未提供)

- 盛装清洗溶液的容器。
- 准确移取15μl的微量移液器
- 蒸馏水
- 准确移取100μl的8通道微量移液器
- 微孔板 振荡器(300rpm)
- 酶标仪

实验步骤

为获得最佳实验性能，请按以下说明所示进行实验。使用前，将所有溶液平衡至室温。在18~22°C下进行实验。

确定实验所需微孔板数量。建议每一样本设两个平行孔。另外，每轮实验共需要14管用于标准品和

质控。将适当数量的微孔板置于塑料框架上。将未使用的微孔板与干燥剂一起密封于锡箔袋中。

1. 加入标准、质控和待测样本

移取15µl**标准 品**(瓶A一瓶F)，**质控** (瓶CO)或待测样本于微孔板中。

2. 微孔板孵育

向各孔加入100µl**一抗溶液**(1号瓶)。用封口膜密封微孔板，在18—22°C, 以 300rpm 在微孔板振荡器上孵育60±5分钟。

3. 清洗

清洗溶液(瓶W) 以1体积浓缩缓冲溶液+50体积蒸馏水的比例稀释。用稀释的清洗缓冲液手工清洗微孔板5次。

使用自动洗板机，请参照产品说明或实验室指南。通常清洗3—5次。确保每次手工或自动清洗后将微孔板中的溶液倒干净。

4. 与过氧化物酶偶联抗体孵育

向各孔加入100µl**过氧化物酶偶联抗体**(2号瓶)。用封口膜密封微孔板，在18—22°C以300rpm在振荡器上孵育60±5分钟。

5. 清洗

见第3步。

6. 与生色底物溶液孵育

向各孔加入100微升**底物溶液**(瓶TMB)，用封口膜密封， 18—22°C，在振荡器上（300rpm）避光孵育15 ± 2分钟。

不要直接从盛TMB底物的小瓶吸取，将所需体积的TMB移入一干净容器中使用。容器中剩余的底物应予丢弃，不要倒回3号 瓶中。

7. 终止显色反应

向各孔加入100 微升**终止溶液**(瓶ST)。

8. 测定吸光度

在2小时内以650nm为参照测定450nm下的吸光度。

检测范围

如果待测样本的吸光度低于**标准F**, 应该用**标准A**稀释样本并重新分析。

质量控制

良好实验室管理规范(GLP)要求在每轮实验中使用质控品以检测实验操作质量。质控应以待测样本对待，并用适当的统计方法分析结果。

【参考值（参考范围）】

建议实验室建立自己的正常值和病理值的范围。各类人群的平均值和标准差举例如下。所有样本均采自第二次晨尿。

详细内容请参阅参考文献。

人群	人数	尿CrossLaps®平均值(ng/mL)	SD
绝经前妇女	175	220	128
绝经后妇女[1)]	250	363	160
男性	249	207	128

个体日间差异

评估个体日间差异：分析14个健康绝经妇女两周以上的5个时间点的尿样(第二次晨尿)

CrossLaps® ELISA (µg/mmol 尿肌酐)								
编号	年龄	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	平均值	SD
001	75	368	331	299	290	307	319	31
002	75	239	261	240	267	247	251	13
003	72	200	193	182	183	185	188	8
004	74	220	218	203	236	203	216	14
005	65	76	78	83	81	72	78	4
006	63	71	52	65	57	59	61	7
007	72	101	135	153	125	106	124	21
008	65	110	104	129	148	141	126	19
009	74	128	134	134	98	131	125	15
010	73	107	131	140	141	117	127	15
011	60	109	124	107	109	114	113	7
012	54	98	112	107	104	113	107	6
013	53	362	433	424	392	479	418	44
014	73	117	142	136	111	99	121	18
平均值	68							16
SD	7.80							10.87

【检验结果的解释】

结果处理

- 计算样本平行孔吸光度的平均值，构建六个标准品A一F的吸光度平均值（纵坐标）对相应CrossLaps®浓度（横坐标）的标准曲线。绘制最佳拟合曲线。也可使用四参数对数曲线拟合。
- 用内推法确定质控和待测样本中CrossLaps®的浓度

结果举例

标准品/ 质控CO/ 待测样本	CrossLaps®浓度 (µg/L)	$A_{450-650}$ 吸光度1/ 吸光度2	$A_{450-650}$ 平均值	内推CrossLaps® 浓度 (µg/L)
标准A	0	2.041 / 2.077	2.059	
标准B	141	1.769 / 1.773	1.771	
标准C	310	1.300 / 1.366	1.333	
标准D	872	0.887 / 0.930	0.909	
标准E	2560	0.524 / 0.569	0.547	
标准F	7622	0.321 / 0.356	0.339	
质控CO		0.818 / 0.864	0.841	980
样本1		0.475 / 0.482	0.479	3128
样本2		1.438 / 1.463	1.450	277

请注意: 以上数据仅为举例，不可用于计算其它实验的结果。

计算校正CrossLaps®值

应测定每一样本的CrossLaps®浓度(µg/L)和尿肌酐浓度(mM=mmol/L)。建议用Jaffe(3)或类似方法测定尿肌酐。

用以下公式进行尿液中CrossLaps®的校正：

CrossLaps®校正值(µg/mmol) = CrossLaps®(µg/L) /尿肌酐(mM)

【产品性能指标】

检测极限: 50µg/L

此值为低于CrossLaps®标准品A 21个测定平均值两个标准偏差所对应的浓度。

精确度

以下结果由检验四个样本，每一样本一式五份，连续测定五天得出(每个样本共测定25次)。

批间CV(n=25)

平均值(μg/L)	SD(μg/L)	CV(%)
240	13.88	5.7
480	13.92	2.9
1340	46.90	3.5
3790	20.47	5.4

批内CV(n=25)

平均值(μg/L)	SD(μg/L)	CV(%)
240	22.56	9.4
480	25.92	4.7
1340	62.98	4.7
3790	32.59	8.6

稀释/线性

尿I型胶原C端肽酶联免疫吸附分析试剂盒的线性范围在100μg/L 到6750 μg/L CrossLaps®。

CrossLaps®浓度为3450-4340μg/L的尿样用标准A稀释后，CrossLaps®的浓度用尿I型胶原C端肽 酶联免疫吸附分析试剂盒(Urine CrossLaps® ELISA)测定 。原尿样的浓度设为100% 。

样本	稀释	期望值(μg/L)	测得值(μg/L)	校正值(μg/L)	回收率 %
1	净样	3450	3450	3450	100
	1:2	1730	1680	3360	97
	1:4	860	790	3160	92
	1:8	430	440	3520	102
2	净样	4060	4060	4060	100
	1:2	2030	2200	4400	108
	1:4	1015	1070	4280	105
	1:8	508	550	4400	108
3	净样	4340	4340	4340	100
	1:2	2170	2180	4380	101
	1:4	1085	1150	4600	106
	1:8	443	510	4080	94
平均值					101

回收率

加入不同量的CrossLaps®抗原至三个不同尿样，制备混合样品。

样本	起始浓度 (μg/L)	加入浓度 (μg/L)	期望值(μg/L)	测得值(μg/L)	回收率%
1	410	130	540	560	106
	410	380	790	870	110
	410	1130	1540	1670	108
2	500	130	630	560	89
	500	380	880	790	90
	500	1130	1630	1590	98
3	520	130	650	590	91
	520	380	900	790	88
	520	1130	1650	1390	84
平均值					96

【注意事项】

- 所有试剂和实验室设备应按感染物品处理丢弃。
- 试剂盒应在有效期限之内使用，不要将不同批号的试剂混合。

【参考文献】

1. Burgeson RE. New collagens, new concepts. Annu Rev Cell Biol 1988; 4:552-577.
2. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. Clin Chem 1997;40:2022-2025.
3. Jaffe M. Ueber den niederschlag, welchen picrinsaure in normalen harn erzeugt und uber eine neue reaction des kreatinins. Hoppe Seylers Z Phys Chem 1986;10:391-400.
4. Garnero P, Gineyts E, Delmas PD. Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. J Clin Endocrinol Metab 1994;79:780-785.
5. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C.Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps™) - follow up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:864-868.
6. Delmas PD,C.E.G.P.F.P.d.V.M.C.C.A.JC. A combination of low doses of 17 beta-estradiol and norethisterone acetate prevents bone loss and normalizes bone turnover in postmenopausal women. *Osteoporos Int* **11**, 177-187 (2000).
7. Ravn P,N.G.C.C. Association between pharmacokinetics of oral ibandronate and clinical response in bone mass and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone* **30**, 320-324 (2002).
8. Buclin T,R.M.B.P.A.M.A.M. Bioavailability and biological efficacy of a new oral formulation of salmon calcitonin in healthy volunteers. *J Bone Miner Res* **17**, 8-1478 (2002).
9. Ravn P,C.J.B.M.C.B. Changes in biochemical markers and bone mass after withdrawal of ibandronate treatment: prediction of bone mass changes during treatment. *Bone.* **22**, 559-564 (1998).
10. Fledelius C,J.A.C.P.B.M.Q.P. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the Cterminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem* **272**, 9755-9763 (1997).
11. Garnero P,D.-M.P.H.D.S.A.B.G.M.P.D.PD. Do markers of bone resorption add to bone mineral density and ultrasonographic heel measurement for the prediction of hip fracture in elderly women? The EPIDOS prospective study. *Osteoporos Int* **8**, 563-569 (1998).
12. Bjarnason NH,C.C. Early response in biochemical markers predicts long-term response in bone mass during hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *Bone.* **26**, 561-569 (2000).
13. Delmas PD,H.P.G.P.D.M. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone* **26**, 553-560 (2000).
14. Tsai KS,Y.M.P.H.W.M.C.W.H.S.Y.B.H.KE. Raloxifene versus continuous combined estrogen/progestin therapy: densitometric and biochemical effects in healthy postmenopausal Taiwanese women. *Osteoporos Int* **12**, 1020-1025 (2001).
15. Peichl P,G.A.M.M.M.R.K.W.B.H. Serum osteocalcin and urinary crosslaps are suitable markers of bone turnover in response to short-term hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol.* **14**, 374-381 (2000).
16. Hoshino H,T.M.K.K.O.T.I.T. Urinary excretion of type I collagen degradation products in healthy women and osteoporotic patients with vertebral and hip fractures. *Calcif Tissue Int* **62**, 36-39 (1998).

【生产企业】

生产者名称：英国 Immunodiagnostic Systems Linited(IDS Ltd)
生产者/生产场所地址：10 Didcot Way,Boldon　Business Park,Boldon,Tyne&Wear,NE35 9PD,UK
联系方式：+44 (0) 191 519 0660
传真：+44 (0) 191 519 0760
网址：www.idsltd.com

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司
地址：北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室
电话：+86 10 58895646　+86 20 32293178
传真：+86 10 58895611　+86 20 32293177
电子邮箱：info@rz-biotech.com
网址：www.rz-biotech.com

【医疗器械注册证书编号】
国食药监械（进）字 2006 第 3401264 号

【产品标准编号】
YZB/DAM 0137-2006

【说明书批准及修改日期】

仅供参考，请以原版英文说明书为准！